



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Stamcellsbehandling för broskregeneration hos häst

Kristin Syrén

Uppsala
2018

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen
Delnummer i serien: 2018:78

Stamcellsbehandling för broskregeneration hos häst

Stem cell treatment for regeneration of cartilage in horses

Kristin Syrén

Handledare: Maria Löfgren, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Maria Löfgren, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien: 2018:78

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: stamcellsbehandling, häst, brosk, mesenkymala stamceller, regeneration

Key words: stem cell treatment, stem cell therapy, horse, cartilage, regeneration

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning.....	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder.....	3
Litteraturoversikt	4
Synovialleden	4
Broskets uppbyggnad och funktion	4
Endokondral benbildning.....	5
Ledskador och osteoartrit	5
Traditionella behandlingsmetoder vid ledproblem hos häst.....	5
Vad är stamceller?	6
Var i brosket finns stamcellerna	6
Vilka markörer finns för stamceller.....	7
Kan stamcellerna aktiveras för att bilda nytt brosk	8
Hur framställs mesenkymala stamceller?	9
Kan företagen som säljer stamcellsbehandlingen garantera nytt friskt brosk	9
Diskussion	11
Litteraturförteckning	13

SAMMANFATTNING

Ledsjukdomar som osteoartrit (OA) och degenerativa sjukdomar till följd av en lokal broskskada eller mjukvävnadsskada är svåra att behandla. Detta beror till stor del på att hos vuxna individer har brosk en dålig regenerativ kapacitet. Detta leder vanligen till nedsatt prestation hos sporthästar och innebär ofta tidig pensionering. Många medicinska behandlingar handlar om att minska smärtan och förhindra att sjukdomen fortsätter att utvecklas snarare än att försöka bilda nytt brosk.

Mesenkymala stamceller (MSC) är multipotenta och kan utvecklas till flera celltyper, däribland adipocyter, kondrocyter och osteoblaster. MSC som används inom hästmedicin för att behandla ledsjukdomar kan antingen vara från hästen som ska behandlas (autologa) eller från en donator (allogena). De tas vanligen från benmärg men kan också utvinnas från till exempel fettvävnad eller perifert blod. Dessa odlas sedan i speciella medium i minst 2 veckor för att uppnå tillräckligt antal med MSC för att behandla skadan.

MSC är intressanta på grund av deras förmåga att differentiera till olika typer av celler samt deras immunosuppressiva förmåga. MSC visar stora möjligheter för behandling på häst, det har därför forskats mycket på MSC med förhoppning om att de ska ha förmåga att bilda nytt brosk efter en broskskada. Det finns ett antal studier, kliniska och experimentella, med både naturliga och inducerade ledsador. Det finns dock relativt få studier publicerade och många av dessa saknar kontrollgrupp. Trots detta används behandling med MSC idag kliniskt i stora delar av världen. Det har setts kortvariga effekter såsom minskad hälta och reducerad svullnad i leden. Att effekt ses tidigt kan snarare bero på MSC immunmodulerande och antiinflammatoriska effekter än dess förmåga att bilda nytt brosk.

Stamcellslika progenitorceller har upptäckts på flera lokaliseringar, Ranviers zon, perikondriet samt yt-zonen i ledbrosket. Dessa kan fungera som en inneboende celltyp med förmåga att reparera broskskador. Markörerna som idag finns för mesenkymala stamceller är inte optimala då de ej är specifika för just denna celltyp. STRO-1 är dock den som är mest lovande då kondrogena progenitorceller från flera områden i brosket uttrycker denna.

Syftet med denna litteraturstudie är att få fram mer information om behandling med MSC. Frågor som varit grund för arbetet är: Vad är stamceller? Var finns de i kroppen? Hur kan dessa påverkas till att börja bilda nytt brosk? Vilka markörer finns för MSC? Kan företagen som säljer stamcellsbehandlingarna garantera nytt friskt brosk?

Sammanfattningsvis så är MSC en intressant behandlingsform som visat positiva resultat, om än dock inte alltid långvariga. Broskregenerationen har varit varierande och många effekter som setts har snarare berott på antiinflammatoriska egenskaper hos MSC. Företagen kan inte garantera nytt friskt brosk då MSC haft problem med att implanteras när de injiceras i leden i en suspension. Fler studier skulle behöva genomföras, med många hästar och under en längre tid för att veta mer om MSC förmåga till läkning utav broskskador.

SUMMARY

Joint diseases like osteoarthritis (OA) and degenerative joint disease because of local cartilage injury or injury to the soft tissues in the joint are difficult to treat. Articular cartilage in adult individuals have poor regenerative capacity, in horses this often leads to impaired performance and early retirement. Many of the medical treatments available are focused on reducing pain and to prevent further development of the disease rather than producing new healthy cartilage.

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent and capable of differentiating into different cell types, such as adipocytes, chondrocytes and osteoblasts. MSC used in veterinary medicine for treating joint disease in horses can be autologous or allogenic. MSCs are usually extracted from bone marrow but can also be extracted from adipose tissue or peripheral blood. These cells are then cultured in specific mediums for at least 2 weeks to achieve enough stem cells to treat the injury.

MSCs are interesting because of their ability to differentiate to different cell types and their immunosuppressive ability. MSCs are promising in the field of treating horses and research has been done on MSCs with hope that they will be capable of regenerating the articular cartilage after a joint injury. There are studies, clinical and experimental, with both induced and natural injuries. However, there are relatively few studies published and a lot of them are missing a control group. Despite of this, treatment with MSCs are used clinically around the world. Short term effects as reduced lameness and swelling of the joint has been observed. The early effects observed could be explained by immunomodulatory and anti-inflammatory effects of MSCs rather than their ability to produce cartilage.

Stem cell-like progenitor cells have been discovered in multiple locations such as the zone of Ranvier, the perichondrium and the superficial zone of articular cartilage. These could function as a native cell type with ability to repair cartilage lesions. The markers available today for chondrogenic MSCs are not optimal because they are not specific for this cell type. STRO-1, is the most promising one since it is expressed by progenitor cells in multiple locations throughout the cartilage.

The purpose of this literature study was to get more information about treatment with MSCs. Questions that this study intended to answer was: what are mesenchymal stem cells? Where are they located in the horse? How can these be affected to start producing new cartilage? What are the markers for MSCs? Can the companies that sell these stem cell treatments guarantee healthy cartilage?

To summarize, MSCs are an interesting treatment which have showed positive results, although not always with long-term effects. Cartilage regeneration has shown various results and many effects that have been seen are probably due to anti-inflammatory properties of MSCs. The companies can not guarantee new healthy cartilage because of MSCs problems with engrafting to cartilage in the joint when injected in suspension. More studies would need to be done, with more horses and for longer duration to learn more about MSCs capability of cartilage regeneration.

INLEDNING

Ledsjukdomar är en av de vanligaste anledningarna till hälta hos hästar, det innebär nedsatt prestation, ofta tidig pensionering, utgör stora kostnader för ägaren och är en stor grund till att hästar avlivas i förtid (Clegg, 2006). Artikulärt brosk har dålig regenerativ kapacitet hos vuxna individer och trauma leder ofta till inflammation i ligament och osteoartrit. Reparationsvävnaden som uppstår består för det mesta av fibröst brosk som inte har samma funktion och styrka som artikulärt brosk har. De flesta makroskopiska skador som uppkommer på brosk läker inte av sig själv, de sprider ut sig lokalt eller ger en utbredd broskdegeneration i leden. Trots att de behandlingar som idag finns har förfinats så är risken att allvarliga ledsador leder till osteoartrit väldigt höga. Detta gör att det finns stort behov för behandlingar som kan stoppa sjukdomsutvecklingen och regenerera nytt brosk (Seol *et al.*, 2012).

Behandling med stamceller har stor potential inom veterinärmedicin och metoderna utvecklas snabbt både experimentellt och kliniskt. Stamcellsbehandling för regeneration av brosk är väldigt aktuellt då rörelsestörningar står för en stor andel av nedsatt prestation hos sporthästar (Branly *et al.*, 2018). Stamcellsbehandling utgår från kroppens förmåga att läka sig själv och dess regenerativa kapacitet. Mesenkymala stamceller (MSC) kan differentiera ut till olika celltyper med rätt stimuli, det gör att det är en lovande behandlingsform för broskskador och osteoartrit då de har förmågan att differentiera ut till kondrocyter. Problem som har uppstått vid intraartikulär injektion av MSC i suspension är att cellerna inte fäster till det kroppsegna brosket och därför inte kan påbörja läkningen av ledbrosket (Whitworth & Banks, 2014).

Syftet med detta arbete är att gå igenom vad stamceller är, var stamcellerna är lokaliserade, hur de kan påverkas till att utvecklas till rätt sorts celltyp, samt vilka markörer det finns som visar att det är MSC. Arbetet syftar även till att utreda huruvida företagen som säljer dessa på marknaden idag kan garantera nytt friskt brosk efter genomförd behandling.

MATERIAL OCH METODER

Litteratur till studien erhöles genom databaserna Web of science, Google scholar, Pubmed och Primo. Sökord som använts är bland annat (stem cell therapy OR stem cell treatment) AND (joint OR cartilage OR regeneration OR marker OR chondrocyte) AND (Osteoarthritis OR joint disease) AND (horse OR equine) En kombination av ovanstående ord användes för sökningen.

Förutom dessa databaser användes även E-böcker och böcker.

Referenslistor från vetenskapliga artiklar har också använts.

LITTERATURÖVERSIKT

Synovialleden

Synovialleden är en komplex struktur med flera delar. Ledbrosket täcker benändarna och ser till att rörelsen i leden blir friktionsfri. Leden stabiliseras av en fibrös ledkapsel vilken är fäst till både kollateralligament och skelettet. Ledkapseln består av två delar, den yttre fibrösa ledkapseln och den inre som kallas synovialmembran. Synovialmembranet har två celltyper, synoviocyt typ B som utsöndrar ledvätska och synoviocyt typ A som är ansvariga för fagocytos. Ledvätskan är lokaliserad i ledhålan och fungerar som smörjning för leden (König *et al.*, 2007).

Broskets uppbyggnad och funktion

Brosk består av extracellulärt matrix (ECM) och kondrocyter. Kondrocyter är den enda celltyp som finns i brosk och utgör ca 2% av den totala volymen. Vissa kondrocyter fortsätter att proliferera hela dess livslängd men hos ledbrosk kan antalet delande celler vara så lågt som 1% av kondrocyterna (Ortved & Nixon, 2016).

ECM består mestadels av vatten (upp emot 80%), kollagen (60% av torrsvikt) och proteoglykaner (10–15% av torrsvikt). Den största andelen proteoglykan utgörs av aggregan, vilket interagerar med hyaluronan och bildar stora aggregat med hjälp av länkproteiner. Aggregan finns i det interfibrillära utrymmet hos ECM och förser brosket med dess osmotiska kapacitet som är nödvändigt för att det ska kunna verka tryckutjämnande och stötdämpande (Fox *et al.*, 2009).

Typ II kollagen står för 90-95% av kollagenet i ECM och bildar fibrer sammanvävt med proteoglykanaggregat, detta ger brosket dess draghållfasthet. Det finns också en liten mängd glykoproteiner och icke-kollagena proteiner. Brosk saknar nerver, är inte kärlförsörjt och mottar sin näringstillförsel genom diffusion från ledvätskan. Broskets uppgift är att fungera tryckutjämnande och stötdämpande samt att se till att det är låg friktion i leden (Fox *et al.*, 2009).

Brosk är uppdelat i flera zoner, den tunna ytliga zonen, mellanzonen och den djupa zonen. Den ytliga zonen skyddar de undre lagren från skada och utgör mellan 10-20% av broskets tjocklek. Kollagenfibrerna i denna zon är tätt packade, parallella med ledytan och kondrocyterna är i stor grad utplattade (Fox *et al.*, 2009).

Mellanzonen fungerar som en bro mellan den ytliga och djupa zonen, den utgör 40-60% av den totala broskvolymen och innehåller tjockare fibrer och proteoglykaner. Kondrocyterna i denna del ligger utspridda i brosket, är sfäriska och har en låg densitet. Funktionellt fungerar mellanzonen som skydd mot tryck (Fox *et al.*, 2009).

Den djupa zonen utgör ungefär 30% av det totala brosket. Kollagenfibrerna ligger vinkelrätt mot ledytan. Kondrocyterna är arrangerade i kolumner, parallellt med kollagenfibrerna och även de vinkelrätt mot ledytan. Den djupa zonen har tjockast fibrer, högst proteoglykaninnehåll och minst vatten (Fox *et al.*, 2009).

Endokondral benbildning

Endokondral benbildning sker i långa rörben, revben, sternum och ryggkotor. Vid endokondral benbildning så bildar mesenkymala progenitorceller förtätningar där benen kommer bildas. De mesenkymala progenitorcellerna differentierar till kondrocyter som bildar ECM vilket innehåller mycket typ II kollagen och proteoglykaner. På detta sätt bildas en broskmodell vilket fungerar som en mall för det framtida skelettet (Hall & Hall, 2005).

Brosket förstoras genom kondrocytproliferation och produktion av matrix. Kondrocyterna i mitten av broskmodellen slutar att proliferera, mognar och blir hypertrofiska. De stora hypertrofiska kondrocyterna utsöndrar ett speciellt matrix bestående av typ X kollagen. De hypertrofiska kondrocyterna påverkar de andra cellerna runt broskmodellen att differentiera till osteoblaster som bildar mineraliserat benmatrix. Denna benmanschett fungerar som en startpunkt för det kompakta, lamellära benet som gör långa rörben starka och rigida (Maes & Kronenberg, 2016).

Ledskador och osteoartrit

Osteoartrit karakteriseras av en progressiv, inflammatorisk och nedbrytande sjukdom av ledbrosket, närliggande ben och mjukvävnad i leden. Ledskador orsakas ibland på grund av mekanisk stress, exempelvis att leden utsätts för fraktur eller slag. Den vanligaste orsaken är dock att leden upprepade gånger under träning utsätts för felbelastning, antingen genom onormal belastning på normalt brosk eller normal belastning på onormalt brosk. Detta kan leda till att inflammatoriska processer startar i en eller fler komponenter i leden och leder till ökad nedbrytning av broskmatrix. Synovit och kapsulit är vanligt i en drabbad led och genom inflammatoriska processer påskyndas den degenerativa processen i leden (Goodrich & Nixon, 2006).

Traditionella behandlingsmetoder vid ledproblem hos häst

Hyaluronsyra finns normalt i ledvätska och ledbrosk. Det syntetiseras av typ B celler i synovialmembranet samt kondrocyter och är en viktig del av ledbroskets extracellulära matrix. Hyaluronsyra tillsammans med aggregan och typ II fibriller ansvarar för draghållfasthet och elasticitet hos ledbrosket. I ledvätska bidrar hyaluronsyra till viskoelasticiteten och fungerar som smörjning för intraartikulära vävnader (Goodrich & Nixon, 2006). Exogen hyaluronsyra har visat sig ha analgetiska effekter vid OA hos häst och människa. Den stimulerar också endogen syntes av hyaluronsyra och proteoglykan. Den exogena hyaluronsyran skyddar även mot förlust av broskmatrix inducerat av inflammatoriska mediatorer (Caron, 2005).

Polysulfaterade glukosaminoglykaner (PS-GAG) är en semisyntetisk substans med ursprung från bovin trachea och består främst av kondroitinsulfat. Exakt verkningsmekanism är ej fastställd, men tros involvera inhibering av prostaglandiner och metalloproteinaser (brosknedbrytande enzymer), stimulering av proteoglykansyntesen samt antiinflammatoriska egenskaper. En del studier visar dock att PSGAG skulle kunna fördröja

mognaden av broskets läkningsvävnad och intramuskulärt har det inte kunnat bevisas vara effektivt (Wanamaker, 2009).

Glukokortikoider är ett mycket potent antiinflammatoriskt läkemedel. De inhiberar uttryck av inflammatoriska mediatorer som interleukiner, minskar produktion av prostaglandiner och hindrar leukocytmigration och adhesion. Glukokortikoider har i låga doser visat sig förhindra uttryck av IL-1 och TNF α , vilka är de viktigaste mediatorerna vid brosknedbrytning. I djurstudier in vitro har det i låga doser visat på broskskyddande effekter utan att påverka kondrocyterna negativt (Caron, 2005).

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) är det mest använda läkemedlet på grund av dess analgetiska, antiinflammatoriska och antipyretiska effekter. NSAID hindrar cyklooxygenas (COX) att omvandla arakidonsyra från fosfolipider i cellmembranet till prostaglandiner och tromboxaner. NSAID används främst för att lindra smärtan och förhindra vidare utveckling av sjukdomen i leden och inte för att regenerera den nedbrutna vävnaden (van Weeren & Back, 2016).

Vad är stamceller?

MSC är multipotenta, adulta progenitorceller som finns i benmärg, navelsträngen och fettvävnad. MSC har förmågan att förnya sig själva samt att differentiera ut till de olika celltyperna adipocyter, kondrocyter och osteoblaster. Under normala odlingsförhållanden ska stamcellerna vara spindelformade. Mesenchymal stem cell committee of International Society for Cellular Therapy (ISCT) har bestämt att MSC måste adherera till plast i standardodlingsförhållanden när kulturflaskor används (Wang & Zhao, 2013). Förmågan att adherera till plast används för att kunna skilja MSC från hematopoetiska stamceller när odlingsmediet byts ut, vanligtvis efter 2 dagar (Taylor *et al.*, 2007).

En viktig anledning till att MSC blivit så intressanta vid terapeutiska behandlingar är att de tros vara hypoimmuna, troligen på grund av avsaknad av uttryck för MHCII. I studier har dock setts att MHCII negativa MSC skulle kunna uppreglera sitt MHCII uttryck när de placeras i en vävnad med aktiv inflammation (Whitworth & Banks, 2014).

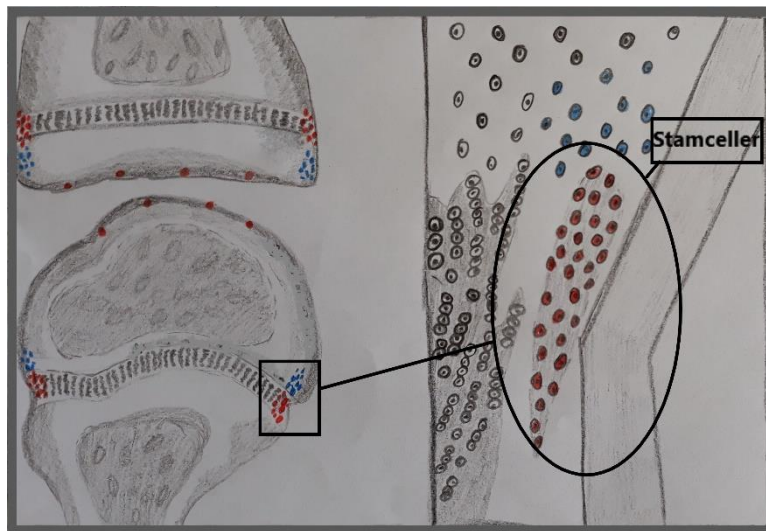
MSC fungerar immunmodulerande vilket är en ännu en anledning till att de används i kliniska studier. De kan påverka funktioner hos immunförsvaret genom att interagera med immunceller som T-lymfocyter, B-lymfocyter och dendritiska celler. MSC kan också förhindra frisättning av proinflammatoriska cytokiner som IL-1, TNF-alfa och IFN-gamma. De kan även stimulera frisättningen av regulatoriskt IL-6 (Whitworth & Banks, 2014).

Var i brosket finns stamcellerna

Flera studier har visat att det finns stamcellsliknande celler i Ranviers zon. Ranviers zon är belägen i periferin av den epifyseala tillväxtplattan och är en fibrös broskstruktur som omger tillväxtplattan och omsluter benet, se figur 1. Här finns kondrocytprogenitorer med en hög proliferativ kapacitet som är ansvariga för tillväxten av omkretsen av brosket (Walzer *et al.*, 2014).

Cellerna och matrix i Ranviers zon är uppdelad i tre anatomiska grupper. Den första innehåller fibroblaster och fibrer som är en fortsättning på periostets fibrösa lager och fungerar som tak över Ranviers zon. De här vävnadsbuntarna fungerar som ett mekaniskt stöd för epifysens tillväxtplatta och fäster periostet till benet under utvecklingen. Den andra gruppen är belägen innerst i klyftan mot brosket och består av väldigt tätt liggande celler. Den tredje gruppen består av mer glest liggande bindvävsceller, både omogna och mer mogna, dessa återfinns mellan de tätt packade cellerna, brosket och det fibrösa taket (Shapiro *et al.*, 1977).

De tätt packade cellerna har en morfologi som påminner om stamceller. Cellerna i detta område uttrycker ett flertal markörer för stamceller, de som uttrycktes i störst antal var STRO-1 och Jagged-1. Samexistens av markörer för stamceller samt markörer som minskar antalet progenitorceller tyder på att det finns en fin balans utav cellförnyelse i Ranviers zon (Karlsson *et al.*, 2009).



Figur 1. Stamcellernas lokalisering i leden (bild modifierad från Karlsson *et al.*, 2009).

I en studie av Löfgren *et al.*, (2014) beskrevs för första gången en struktur som liknar Ranviers zon hos häst. I denna zon fanns celler som uttryckte STRO-1, chondroadherin och epidermal growth factor like protein 7 (EGFL7). STRO-1 uttrycktes också hos celler nära perikondriet mellan Ranviers zon och det artikulära brosket, vilket kan tyda på att cellerna vandrar i brosket. Dessa kroppsegna celler med STRO-1 uttryck skulle möjligen kunna reparera skador i ledbrusket. I studier har progenitorceller även hittats i det artikulära broskets ytzon. Det är troligen dessa progenitorceller som tillåter längdtillväxt hos långa rörben (McCarthy *et al.*, 2012).

Vilka markörer finns för stamceller

Det finns ingen ensam cellspecifik markör för att direkt kunna identifiera kondrogena stamceller eller progenitorceller. Det har dock rekommenderats att MSC måste uttrycka vissa cellytemarkörer, $\geq 95\%$ av cellerna måste uttrycka: CD73, CD90 samt CD105 (Wang & Zhao, 2013).

CD73 omvandlar extracellulärt adenosinmonofosfat till adenosin. Den uttrycks på ett flertal celler till exempel lymfocyter, epitelceller och fibroblaster. I en studie som utfördes av Haynesworth *et al.*, (1992) så skulle CD73 vara MSC specifika. Det finns dock än idag inga bevis på att någon anti-CD73 antikropp kan detektera MSC *in vivo* (Lin *et al.*, 2013).

CD90 är involverad i cell-cell och cell-matrixinteraktioner. Den är inte cellspecifik och tycks inte vara välbevarad evolutionärt, därmed kan vanligt använda CD90 antikroppar möjligen vara inkapabla till att reagera med MSC från vissa arter. Detta gör att CD90 inte är en optimal markör för MSC *in vivo* (Lin *et al.*, 2013).

CD105 är ett typ I membranprotein som fungerar som en accessorisk receptor för TGF- β familjen. Det har hög affinitet för endotel, uttrycks i stor grad på syncytiotrofoblaster och i lägre grad på monocyter, kondrocyter, fibroblaster och hematopoetiska progenitorceller. MSC från fettväv har visat sig uttrycka CD105 i låga mängder precis efter isolering men uttrycker högre mängd ju fler odlingspassager de genomgår. MSC från andra vävnader måste genomgå odlingspassager på grund av att de extraheras i väldigt liten mängd, huruvida de har lågt uttryck för CD105 vid isolering är okänt. Med tanke på hur det ser ut för CD105 i fettväv så är det dock inte troligt att detta är en bra markör för MSC (Lin *et al.*, 2013).

STRO-1 är accepterad som markör för mesenkymala stamceller (Karlsson *et al.*, 2009). STRO-1 är ett protein som uttrycks av endotel och fettvävsderiverade stamceller. STRO-1 uttrycks mycket i odlade MSC men *in vivo* så har den ett samtidigt uttryck för endotel vilket skulle kunna medföra att den inte är helt passande som MSC markör (Lin *et al.*, 2013). I en studie på brosket hos häst har celler som uttrycker STRO-1 återfunnits i Ranviers zon, i broskets vilozon hos foster, perikondriet och i det ytliga och det djupa lagret hos ledbrosket vilket trots allt skulle kunna stärka den som en markör för MSC (Löfgren *et al.*, 2014).

Kan stamcellerna aktiveras för att bilda nytt brosk

En kombination av bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) och transcription growth factor β 1 (TGF- β 1) när cellerna odlas fram under hypoxi har visat sig inducera differentiering av MSC till kondrocyter. Kombinationen av BMP-2 och TGF- β 1 minskar också andelen kollagen typ I. Att odla fram stamcellerna i syrefattig miljö gjorde att de inte blev hypertrofiska och därmed inte började bilda ben istället för brosk. De visade också stamcellsmarkörer i högre utsträckning (Branly *et al.*, 2014).

TGF- β 3 har visat sig viktig för att få stamcellerna att differentiera ut till kondrocyter. Om denna används tillsammans med Mechano Growth Factor (MGF) (en isoform av IGF-1 som produceras vid stress, sjukdom eller skada) fungerade de synergiskt och gav en 1,8-2 ggr högre cellrekrytering både *in vivo* och *in vitro* än om endast TGF- β 3 användes (Luo *et al.*, 2015).

I studier som genomfördes på chimära möss (embryonala stamceller sätts in i en blastocyst vilken sedan inplanteras i en mushona, så att avkomman får två olika genetiska uppsättningar) visade det sig att SOX-9 är en transkriptionsfaktor för kondrocytdifferentiation och broskformation. Mesenkymala celler som saknade SOX-9

verkar inte vara kapabla att differentiera ut till kondrocyter (Bi *et al.*, 1999). SOX-9 kan även användas som en markör för kondrogenes (Taylor *et al.*, 2007).

Hur framställs mesenkymala stamceller?

Företagen använder MSC taget från vuxna hästar. Stamcellerna kan vara antingen autologa, att de har tagits från individen som ska behandlas, eller så är de allogena och kommer då från en donator. Vanligast är MSC med benmärgshärstamning som tas från sternum eller pelvis, annars används fettvävsderiverade stamceller som vanligen tas från svansroten på hästen. Stamceller som tas från fettväven odlas antingen fram på laboratorium eller behandlas för att få fram adipose derived stromal vascular fraction vilket kan injiceras i leden inom 2–4 h (Schnabel *et al.*, 2013). Stamceller kan även framställas ur perifert blod, men det är inte den vanligaste varianten kliniskt. Andelen MSC i benmärgen är väldigt låg, ungefär 0,001–0,01% av cellerna i ett aspirat (Whitworth & Banks, 2014). Stamcellerna odlas sedan på laboratorium i speciella medium i 2–3 veckor för att uppnå tillräckligt stor mängd stamceller för behandling av den skadade leden (Schnabel *et al.*, 2013).

Kan företagen som säljer stamcellsbehandlingen garantera nytt friskt brosk

De kommersiella MSC-behandlingarna som finns idag för behandling av broskskador innebär att en suspension med stamceller injiceras vid ledytan. Stamceller som administreras på detta sätt har svårt att integreras med det endogena brosket. Stamcellerna fäster istället till mjukdelar och återfinns till exempel i ledkapseln enligt flera studier (Whitworth & Banks, 2014).

Problem som finns med att implantera stamceller vid broskdefekter är att de inte differentierar till kondrocyter utan blir hypertrofiska och bildar ben istället vilket inte är önskvärt. Det kan även bildas fibrös broskvävnad vilket inte har samma funktion som det normalt artikulärt brosk har (Whitworth & Banks, 2014).

Stamceller tas antingen från benmärg eller fettväv, när dessa jämförts *in vitro* så har benmärgsderiverade stamceller visat signifikant större kondrogen potential jämfört med fettvävsderiverade stamceller. Vid ett *in vivo* försök på hästar med synovit påvisade en signifikant minskning av prostaglandin E2 (PGE2) hos hästar behandlade med benmärgsderiverade stamceller jämfört med hästar behandlade med fettvävsderiverade stamceller där även mängden Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) var signifikant högre (Ferris *et al.*, 2014).

Det har diskuterats huruvida autologa eller allogena stamceller ger bäst resultat och om allogena stamceller har en högre risk att producera ett immunsvär. I en studie som utfördes på 6 friska hästar som injicerades totalt tre gånger, första gången var med autologa benmärgsderiverade MSC i tarsus. Hästarna injicerades därefter två gånger till, med 10 dagars mellanrum, i radialis carpi med allogena benmärgsderiverade MSC. Leden på den motsatta sida injicerades vid alla tre tillfällen med ringer-lösning med laktat som kontroll. En något förhöjd nivå av vita blodkroppar, totalt protein och antal neutrofiler sågs i ledvätskan hos de behandlade med allogena och autologa MSC. I alla tre tillfällen sågs en

övergående svullnad i lederna som behandlats med MSC som försvann av sig själv inom 10 dagar. Ingen av hästarna visade några tecken på hälta efter injektionerna. Dock gjordes dessa tester på friska leder utan inflammerad vävnad och kan därför inte direkt jämföras med en led med naturligt uppkomna broskskador (Ardanaz *et al.*, 2016).

Wilke *et al.*, (2007) utförde en studie med 6 hästar där en fokal broskskada inducerades i knäleden bilateralt. Den ena sidan behandlades med en injektion av benmärgsderiverade MSC och den andra fungerade som kontroll. Efter 30 dagar sågs en bättre läkning och en större andel typ II kollagen än hos kontrollgruppen. Efter 8 månader avlivades hästarna och broskets uppbyggnad undersöktes. Inga signifikanta skillnader sågs efter 8 månader mellan kontrollgruppen och gruppen som behandlades med MSC.

I en studie där hästar med inducerade broskdefekter samt mikrofrakturer i knäna bilateralt, fick benmärgsderiverade MSC och hyaluronan på ena sidan, på andra sidan enbart hyaluronan en månad efter inducering av skadan. Hästarna fick stå på boxvila i 4 månader, handpromenerades i 2 veckor för att sedan tränas upp successivt på löpband till en nivå som motsvarade löpträning. Efter 1 år avlivades hästarna, den led som hade blivit behandlad med både MSC och hyaluronan visade på signifikant ökning av läkningsvävnadens fasthet, kvalitet och koncentrationen av aggregat jämfört mot den led som endast behandlats med hyaluronan (McIlwraith *et al.*, 2011).

I en studie innehållande 20 hästar med naturligt uppkommen degenerativ ledsjukdom i kotleden delades upp i 4 grupper med 5 hästar i varje grupp. En grupp behandlades med platelet rich plasma (PRP), en med MSC, en grupp med MSC tillsammans med PRP och den sista gruppen PRP tillsammans med kondrogent inducerade MSC. De mesenkymala stamcellerna i denna studie deriverades från perifert blod som donerades av en 6 år gammal valack. Samma häst användes även till att ta fram PRP och därmed standardiserades testet ytterligare. Hästarna följdes upp efter 6 veckor, 12 veckor, 6 månader och 12 månader. Bedömningen genomfördes av två veterinärer, oberoende av varandra med tre parametrar, klinisk hälta, böjprov samt svullnad i kotleden. Kombinationen av PRP och MSC visade stora kliniska förbättringar jämfört med de som endast behandlats med ett preparat. De högsta kliniska resultaten uppnåddes med de kondrogent inducerade MSC tillsammans med PRP, där 4 av 5 hästar var helt fria från hälta efter 12 månader (Broeckx *et al.*, 2014).

DISKUSSION

Det finns ett stort behov av en behandlingsform som kan nybilda brosk, läka broskskador och bota osteoartrit. Idag består de flesta behandlingarna av att dämpa symptomen och inte av att bota sjukdomen. MSC förmåga att differentiera ut till flera olika celltyper, därav kondrocyter, samt ledbroskets dåliga regenerativa kapacitet gör att MSC är intressanta för sjukdomar som bryter ned ledbrosk.

MSC finns på marknaden runt om i världen och enligt företagen som säljer dessa så kan de läka skador på brosket. Flera företag väljer att använda allogena MSC, dels för att kvalitet och kvantitet av MSC tros minska med ålder men också för att kunna sätta in behandling tidigt i sjukdomsskedet. Det finns väldigt få studier på huruvida allogena stamceller kan sätta igång en immunreaktion och om de är lika effektiva som autologa stamceller. Med de fåtal studier som finns om detta så verkar det inte som att allogena MSC ger signifikant immunreaktion om någon alls, och skulle därför kunna användas lika gärna som autologa MSC (Ardanaz *et al.*, 2016). Fler studier skulle behöva genomföras *in vivo* som jämför allogena och autologa MSC. Dessa studier skulle behöva utföras på hästar med naturligt uppkomna broskskador och inflammation i leden.

Behandling som sker med benmärgsderiverade MSC har visat sig ha större kondrogen potential än de som är deriverade från fettvävnad. Har dessa celler dessutom inducerats under kondrogen inverkan så ökar den potentialen ytterligare (Broeckx *et al.*, 2014). Att fettvävsderiverade MSC också har visat sig ha ett högre inflammatoriskt påslag med en högre nivå av TNF- α och PGE2 tyder även detta på att benmärgsderiverade MSC är mer lovande ur terapeutisk synpunkt (Ferris *et al.*, 2014). Trots detta använder en del företag sig av MSC deriverat från fettvävnad.

I studier har det visats att MSC ger bäst läkning och broskregeneration i kombination med andra preparat. Detta har setts tillsammans med hyaluronan, dock med en kortvarig effekt (Frisbie *et al.*, 2009) samt PRP med en mer långvarig effekt (Broeckx *et al.*, 2014) där kombinationen av MSC med preparaten verkar ge en synergisk effekt. När MSC injiceras i leden utan något kombinationspreparat så har stamcellerna svårt att integreras med det endogena brosket och börja producera nytt friskt brosk (Whitworth & Banks, 2014). Fler studier för att se vilket preparat som i kombination med MSC ger bäst broskregeneration hade behövt utföras.

Det finns olika åsikter om när behandling med MSC ger bäst resultat. Vissa anser att behandlingen bör sättas in tidigt innan det hunnit bildas ärrvävnad medan andra anser att den inte har någon effekt så länge leden är inflammerad som vid akut trauma. MSC skulle dock kunna ha en positiv effekt tidigt i den akut traumatiserade leden på grund av sina antiinflammatoriska egenskaper. I studier har det visats att MSC har en effekt på läkning och hålla kort tid efter injektion. Efter några månader sågs dock ingen skillnad mellan kontrollgruppen och gruppen som behandlats med MSC. En förklaring till att effekt ses tidigt kan vara MSC immunmodulerande och antiinflammatoriska egenskaper. Detta kan vara anledningen till varför det endast setts kortvariga effekter vid behandling av mesenkymala stamceller och fler långvariga studier skulle behöva genomföras för att få mer kunskap om reparation och regeneration av ledbrosket (Whitworth & Banks, 2014).

Det finns idag ingen specifik markör för MSC därför är det av stor vikt att fortsätta forskningen för att identifiera en markör som är specifik för dessa. Vid användning av de markörer som finns listade idag så måste deras begränsningar tas med i beräkningen (Lin *et al.*, 2013). STRO-1 har dock visat sig finnas i flera källor till kondrogena MSC vilket trots att de också uttrycks av andra celler ändå kan göra det till en möjlig markör för MSC (Löfgren *et al.*, 2014).

Slutsatsen är att det idag är svårt att säga om stamcellsbehandling för broskregeneration av broskskador fungerar. Att företagen erbjuder MSC som behandling kan anses vara för tidigt med tanke på de varierande resultat som setts i de studier som utförts. Det hade varit önskvärt med långtidsstudier där fler hästar med naturligt uppkommen ledsjukdom och osteoartrit ingår, där det även finns en blindad placebogrupp. Det skulle dock vara svårt att genomföra av flera orsaker. Det är dyrt att genomföra långa studier på många hästar samt att det är svårt att få hästägarens samtycke med risk att deras häst går obehandlad vid placebobehandling. Det kan även tyckas att det ur ett etiskt perspektiv inte är försvarbart att låta hästar med ledsjukdomar gå obehandlade under en lång period på grund av smärta och vidare utveckling av sjukdom. Ett alternativ hade varit att behandla den ena gruppen med MSC och den andra gruppen med traditionella behandlingar. MSC verkar lovande för framtiden och är väldigt intressanta ur en terapeutisk synvinkel, det krävs dock mer arbete och studier för att kunna bekräfta dess effekt.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Ardanaz, N., Vázquez, F.J., Romero, A., Remacha, A.R., Barrachina, L., Sanz, A., Ranera, B., Vitoria, A., Albareda, J., Prades, M., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I. & Rodellar, C. (2016). Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. *BMC Veterinary Research*, 12, artikel 65.
- Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R. & de Crombrughe, B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nature Genetics*, 22, s. 85-89.
- Branly, T., Contentin, R., Desancé, M., Jacquet, T., Bertoni, L., Jacquet, S., Mallein-Gerin, F., Denoix, J.-M., Audigié, F., Demoor, M. & Galéra, P. (2018). Improvement of the chondrocyte-specific phenotype upon equine bone marrow mesenchymal stem cell differentiation: Influence of culture time, transforming growth factors and type I collagen siRNAs on the differentiation index. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), artikel 435.
- Branly, T., Hervieu, M., Jacquet, S., Bertoni, L., Gomez-Leduc, T., Desance, M., Rakic, R., Bouyoucef, M., Audigie, F., Legendre, F., Demoor, M., Denoix, J.M. & Galera, P. (2014). Characterization and use of equine bone marrow mesenchymal stem cells in horse cartilage engineering. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22, s. S489.
- Broeckx, S., Zimmerman, M., Crocetti, S., Suls, M., Mariën, T., Ferguson, S.J., Chiers, K., Duchateau, L., Franco-Obregón, A., Wuertz, K. & Spaas, J.H. (2014). Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: A preliminary study. *PLoS ONE*, 9(1), s. e85917.
- Broeckx, S.Y., Spaas, J.H., Chiers, K., Duchateau, L., Van Hecke, L., Van Brantegem, L., Dumoulin, M., Martens, A.M. & Pille, F. (2018). Equine allogeneic chondrogenic induced mesenchymal stem cells: A GCP target animal safety and biodistribution study. *Research in Veterinary Science*, 117, ss. 246-254.
- Caron, J.P. (2005). Intra-articular injections for joint disease in horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 21(3), ss. 559-573.
- Clegg, P.D. (2006). Therapy for osteoarthritis in the horse – How do we know that it works? *The Veterinary Journal*, 171(1), ss. 9-10.
- Ferris, D.J., Frisbie, D.D., Kisiday, J.D., McIlwraith, C.W., Hague, B.A., Major, M.D., Schneider, R.K., Zubrod, C.J., Kawcak, C.E. & Goodrich, L.R. (2014). Clinical outcome after intra-articular administration of bone marrow derived mesenchymal stem cells in 33 Horses with stifle injury. *Veterinary Surgery*, 43(3), ss. 255-265.
- Fox, A.J., Bedi, A. & Rodeo, S.A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*, 1(6), ss. 461-468.
- Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., McIlwraith, C.W. & Werpy, N.M. (2009). Evaluation of polysulfated glycosaminoglycan or sodium hyaluronan administered intra-articularly for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res*, 70(2), ss. 203-209.
- Goodrich, L.R. & Nixon, A.J. (2006). Medical treatment of osteoarthritis in the horse – A review. *The Veterinary Journal*, 171(1), ss. 51-69.

- Hall, B.K. & Hall, B.K. (2005). Bone I: *Bones and Cartilage : Developmental and Evolutionary Skeletal Biology*. Jordan Hill, UNITED STATES: Elsevier Science. Tillgänglig: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/slub-ebooks/detail.action?docID=269859> (2018-03-01)
- Haynesworth, S.E., Barer, M.A. & Caplan, A.I. (1992). Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, 13(1), ss. 69-80.
- Karlsson, C., Thornemo, M., Henriksson, H.B. & Lindahl, A. (2009). Identification of a stem cell niche in the zone of Ranvier within the knee joint. *Journal of Anatomy*, 215(3), ss. 355-363.
- König, H.E. & Liebich, H.-G. (2007). I: Locomotor apparatus. *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals*. 6 uppl. Tyskland:Schattauer Verlag.
- Lin, C.-S., Xin, Z.-C., Dai, J. & Lue, T.F. (2013). Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histology and histopathology*, 28(9), ss. 1109-1116.
- Luo, Z., Jiang, L., Xu, Y., Li, H., Xu, W., Wu, S., Wang, Y., Tang, Z., Lv, Y. & Yang, L. (2015). Mechano growth factor (MGF) and transforming growth factor (TGF)- β 3 functionalized silk scaffolds enhance articular hyaline cartilage regeneration in rabbit model. *Biomaterials*, 52, ss. 463-475.
- Löfgren, M., Ekman, S., Svala, E., Lindahl, A., Ley, C. & Skiöldebrand, E. (2014b). Cell and matrix modulation in prenatal and postnatal equine growth cartilage, zones of Ranvier and articular cartilage. *Journal of Anatomy*, 225(5), ss. 548-568.
- Maes, C. & Kronenberg, H.M. (2016). Chapter 60 - Bone development and remodeling A2 - Jameson, J. Larry. I: Groot, L.J.D., Kretser, D.M.d., Giudice, L.C., Grossman, A.B., Melmed, S., Potts, J.T. & Weir, G.C. (red.) *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders, ss. 1038-1062.e8. Tillgänglig: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323189071000603>. (2018-02-26)
- McCarthy, H.E., Bara, J.J., Brakspear, K., Singhrao, S.K. & Archer, C.W. (2012). The comparison of equine articular cartilage progenitor cells and bone marrow-derived stromal cells as potential cell sources for cartilage repair in the horse. *The Veterinary Journal*, 192(3), ss. 345-351.
- McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Rodkey, W.G., Kisiday, J.D., Werpy, N.M., Kawcak, C.E. & Steadman, J.R. (2011). Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 27(11), ss. 1552-1561.
- Ortved, K.F. & Nixon, A.J. (2016). Cell-based cartilage repair strategies in the horse. *The Veterinary Journal*, 208, ss. 1-12.
- Schnabel, L.V., Fortier, L.A., Wayne McIlwraith, C. & Nobert, K.M. (2013). Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? *The Veterinary Journal*, 197(3), ss. 570-577.
- Seol, D., McCabe, D.J., Choe, H., Zheng, H., Yu, Y., Jang, K., Walter, M.W., Lehman, A.D., Ding, L., Buckwalter, J.A. & Martin, J.A. (2012). Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. *Arthritis & Rheumatism*, 64(11), ss. 3626-3637.

- Shapiro, F., Holtrop, M.E. & Glimcher, M.J. (1977). Organization and cellular biology of the perichondrial ossification groove of ranvier: a morphological study in rabbits. *J Bone Joint Surg Am*, 59(6), ss. 703-723.
- Taylor, S.E., Smith, R.K.W. & Clegg, P.D. (2007). Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Veterinary Journal*, 39(2), ss. 172-180.
- Walzer, S.M., Cetin, E., Grübl-Barabas, R., Sulzbacher, I., Rueger, B., Girsch, W., Toegel, S., Windhager, R. & Fischer, M.B. (2014). Vascularization of primary and secondary ossification centres in the human growth plate. *BMC Developmental Biology*, 14, ss. 36-36.
- van Weeren, P.R. & Back, W. (2016). Musculoskeletal disease in aged horses and its management. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32(2), ss. 229-247.
- Wanamaker, B.P. (2009). *Applied pharmacology for veterinary technicians*. 4th ed. uppl. Philadelphia, Pa.: Philadelphia, Pa. : Saunders.
- Wang, S. & Zhao, R.C. (2013). A historical overview and concepts of mesenchymal stem cells. I: Zhao, R.C. (red.) *Essentials of Mesenchymal Stem Cell Biology and Its Clinical Translation*. Dordrecht: Springer Netherlands, ss. 3-15. Tillgänglig: https://doi.org/10.1007/978-94-007-6716-4_1. (2018-03-02)
- Whitworth, D.J. & Banks, T.A. (2014). Stem cell therapies for treating osteoarthritis: Prescient or premature? *The Veterinary Journal*, 202(3), ss. 416-424.
- Wilke, M.M., Nydam, D.V. & Nixon, A.J. (2007). Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *Journal of Orthopaedic Research*, 25(7), ss. 913-925.